植 物 分 类 学 报 44 (2): 126–134(2006) doi:10.1360/aps040077
Acta Phytotaxonomica Sinica http://www.plantsystematics.com

# 基于ITS序列和*trn*L-F序列探讨小叶锦鸡儿、中间锦鸡儿和柠条锦鸡儿的种间关系

侯 鑫 刘俊娥 赵一之* 赵利清

(内蒙古大学生命科学学院 呼和浩特 010021)

# Interspecific relationships of *Caragana microphylla*, *C. davazamcii* and *C. korshinskii* (Leguminosae) based on ITS and *trn*L-F data sets

HOU Xin LIU Jun-E ZHAO Yi-Zhi* ZHAO Li-Qing

(*College of Life Sciences*, *Inner Mongolia University*, Huhhot 010021, China )

**Abstract** The taxonomic treatment of *Caragana davazamcii* Sancz. has been a controversial matter, as its relationship with *C. microphylla* Lam. and *C. korshinskii* Kom. is not clear. It was treated as an independent species, or a variety under *C. microphylla* or *C. korshinskii*. This study is to examine the interspecific relationship of these three species and the origin of *C. davazamcii* based on internal transcribed spacer (ITS) and non-coding region of chloroplast *trn*L-F, combined with morphological data and geographical distribution. The *trn*L-F sequence of *C. davazamcii* is identical to that of *C. microphylla* but differs distinctly from that of *C. korshinskii*. The high congruence of ITS copies through both direct and cloning sequencing rejects the recent hybridization hypothesis of *C. davazamcii* between *C. microphylla* and *C. korshinskii*. In contrast, two different ITS sequence copies were found respectively in each individual of *C. microphylla* and *C. korshinskii*. One of the two ITS sequences in *C. microphylla* is identical to that of *C. davazamcii*. This result indicates that *C. davazamcii* might have taken part in the hybridization of *C. microphylla* as one parent , or that extensive gene flow might have occurred between these two species, thus resulting in the morphological similarity of them. However, the similarity of some morphological characters of *C. davazamcii* to those of *C. korshinskii* might result from the convergent adaptation to their common ecological environment.

**Key words** *Caragana microphylla* Lam., *Caragana davazamcii* Sancz., *Caragana korshinskii* Kom., ITS, *trn*L-F.

**摘要** 中间锦鸡儿*Caragana davazamcii* Sancz.的分类处理一直存在争议，它与小叶锦鸡儿*C. microphylla* Lam.和柠条锦鸡儿*C. korshinskii* Kom.的关系尚不清楚。该种被处理为一个独立的种或后两个种的变种。本文利用ITS序列和叶绿体*trn*L-F序列，综合形态和地理分布，探讨了中间锦鸡儿的起源及与另外两个种的种间关系。结果显示，中间锦鸡儿的*trn*L-F序列与小叶锦鸡儿完全一致，而与柠条锦鸡儿有明显差异。中间锦鸡儿的ITS序列高度纯合，不支持该种可能是杂交起源的假设。相反，另外两个种的ITS序列均出现多个位点杂合，克隆后均得到2种不同的序列。中间锦鸡儿的ITS序列与小叶锦鸡儿2种序列中的1种完全一致。该结果表明，中间锦鸡儿可能作为亲本之一参与了小叶锦鸡儿的杂交起源，或者基因流是造成这两个种形态相似的主要原因。中间锦鸡儿与柠条锦鸡儿形态上的相似可能是

2004-06-28 收稿, 2005-03-04 收修改稿。

基金项目：国家自然科学基金(30260010)(Supported by the National Natural Science Foundation of China, Grant No. 30260010)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: houxin2001@263.net)。

趋同进化的表现。
关键词　小叶锦鸡儿; 中间锦鸡儿; 柠条锦鸡儿; ITS序列; *trn*L-F序列

豆科Leguminosae锦鸡儿属*Caragana* Fabr.植物在世界上约有80余种, 广布于欧亚大陆的温带地区, 但尤以亚洲大陆的中部种类最多(赵一之, 1993)。我国本属植物最为丰富, 约有60种左右, 而且属内亚属、组、系都有代表, 从森林区到草原区, 直至荒漠区都有分布, 但主要集中分布在草原区和荒漠区(赵一之, 1993)。

锦鸡儿属是研究温带亚洲植物区系形成及系统演化的典型分类群(Komarov, 1945)。该属植物在亚洲大陆中部广泛分布, 形态变异复杂, 对环境(尤其是对干旱和寒冷)的适应以及可能存在的杂交有时模糊了种间的形态学界限, 从而为种间亲缘关系等系统与进化方面的研究带来一系列困难与有趣的争论(赵一之, 1993; Ma et al., 2003a; Zhang, 2004)。该属植物的起源、演变与迁移也一直是学者们研究和讨论的焦点, 虽然新的证据不断增加, 但这方面的探讨还远远没有结束(Zhang, 2004)。

目前国内外学者对于该属小叶系ser. *Microphyllae* (Kom.) Pojark.的小叶锦鸡儿*C. microphylla* Lam.、中间锦鸡儿*C. davazamcii* Sancz.和柠条锦鸡儿*C. korshinskii* Kom. 3个种亲缘关系和分类处理的意义不一, 尤其对中间锦鸡儿这个种是否成立有较大的争议。Sanczir(1974)、富象乾(1977)、刘媖心(1984)不仅承认中间锦鸡儿是一个独立的物种, 而且分别依据该种分布区内不同产地的标本发表了*C. davazamcii* Sancz.、*C. intermedia* Kuang & H. C. Fu和*C. erenensis* Liou f. 3个学名。根据赵一之(1990)的研究, 中间锦鸡儿的正确学名应为*C. davazamcii* Sancz.。对于这3种锦鸡儿, Yakovlev(1988)认为中间锦鸡儿与柠条锦鸡儿属于同一物种, 张明理和朱光华(2004)认为中间锦鸡儿是柠条锦鸡儿的一个变种——*C. korshinskii* Kom. var. *intermedia* (Kuang & H. C. Fu) M. L. Zhang & G. H. Zhu, 而徐朗然和郝秀英(1989)则认为中间锦鸡儿最初由Komarov(1909)定名为小叶锦鸡儿的一个变种——*C. microphylla* var. *tomentosa* Kom., 从而否定了中间锦鸡儿是一个独立物种的观点。赵一之(1993)则承认了3个种的独立地位, 而Ma等(2003a)认为小叶锦鸡儿、中间锦鸡儿和柠条锦鸡儿的地理替代分布是连续过渡的, 是一个连续的地理渐变群。

本文作者发现, 在野外观察到的这3个种的植株的确具有比较相似的形态学特征, 中间锦鸡儿在形态上似介于小叶锦鸡儿和柠条锦鸡儿之间, 尤其与小叶锦鸡儿非常相近。3个种间可供辨别的形态特征的对比见表1。在地理分布上, 小叶锦鸡儿为蒙古高原北部和东部—华北分布种, 较为广布; 中间锦鸡儿分布区位于小叶锦鸡儿的西邻, 为东戈壁—鄂尔多斯—黄土高原分布种; 柠条锦鸡儿为南阿拉善—西鄂尔多斯分布种, 其分布区又位于中间锦鸡儿的西邻。可见中间锦鸡儿的分布区也位于另外两个种之间。这些现象很容易使我们想到: 中间锦鸡儿是否为小叶锦鸡儿和柠条锦鸡儿杂交渗入的后代？或起源于其中一个种, 与另一个种的相似是趋同进化所致？或者其他原因造成3个物种形态上的连续性？本文在前人研究的基础上, 主要利用核基因和叶绿体基因对中间锦鸡儿的起源和这3个种的种间关系进行初步探讨, 为将来研究小叶系以及整个锦鸡儿属内的种间关系提供基础。

核糖体DNA(nrDNA)和叶绿体DNA(cpDNA)是植物系统学研究中常用的分子标记

(高连明等, 2003；王玉金，刘健全, 2004)。nrDNA的转录间隔区(ITS)进化速率较快，且易于用通用引物PCR扩增和测序，所以被广泛应用于属和属以下分类群的系统发育研究中(Baldwin, 1992; Baldwin et al., 1995; Soltis & Soltis,1998)；对于本研究更为重要的是，该核基因可以通过碱基的粘合(additivity)来验证种间杂交(Sang et al., 1995)，因而被广泛应用于网状进化研究中。尽管多数的叶绿体基因进化速率较慢，因而主要用于探讨较高分类群的系统学问题，但是一些进化比较快的叶绿体基因间隔区(如*trn*L-F等)，也可以被有效地应用于较低等级分类群的分子系统学研究(Taberlet et al., 1991; Sang et al., 1997; Bakker et al., 1999; Kajita et al., 1998)。

表1 小叶锦鸡儿、中间锦鸡儿和柠条锦鸡儿的形态学比较
**Table 1** Morphological comparison of *Caragana microphylla*, *C. davazamcii* and *C. korshinskii*

| 性状 Character | 小叶锦鸡儿 *C. microphylla* | 中间锦鸡儿 *C. davazamcii* | 柠条锦鸡儿 *C. korshinskii* |
|---|---|---|---|
| 旗瓣形状 Shape of vexillum | 近圆形 suborbicular | 近圆形 suborbicular | 扁圆形,宽远大于长 oblate, much wider than long |
| 龙骨瓣形状 Shape of keel | 无耳 not auriculate | 具短耳,圆形 with short, rounded auricles | 无耳 not auriculate |
| 小叶形状 Shape of leaflet | 倒卵形或矩圆状倒卵形 obovate or oblong-obovate | 矩圆状倒卵形或矩圆形 oblong-obovate or oblong | 条状披针形 linear-lanceolate |
| 荚果 Pod | 细圆筒形 thinly cylindric | 条状披针形,长为宽的4–7倍 linear-lanceolate, 4–7 times longer than wide | 披针形,长为宽的2.5–4倍 lanceolate, 2.5–4 times longer than wide |
| 植株高 Height of plant (cm) | 50–80 | 100–200 | 300–500 |

本研究选取nrDNA的ITS片段和叶绿体基因间隔区*trn*L-F片段，对ITS片段进行PCR产物直接测序和克隆测序，以考察碱基粘合存在与否，从而验证中间锦鸡儿是否起源于种间杂交；对*trn*L-F片段则只进行PCR产物直接测序。基于这两种DNA片段进行系统发育分析，以期为小叶锦鸡儿、中间锦鸡儿和柠条锦鸡儿的种间关系研究提供新的资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

材料来源见表2。小叶锦鸡儿和柠条锦鸡儿各取2份样品，中间锦鸡儿取3份样品，树锦鸡儿*C. sibrica* Fabr.取1份样品；采集地为内蒙古呼和浩特的样品是内蒙古林业科学院树木园引种的。凭证标本均保存于内蒙古大学植物标本馆。树锦鸡儿属于大叶系ser. *Caragana*，被认为是该属的原始种(赵一之, 1993)，研究中选作外类群。

新采集的样品处理采用硅胶干燥法，在野外采集植物叶片后用变色硅胶迅速干燥，叶片彻底干燥后存放于–80 ℃冰箱备用。二连浩特的中间锦鸡儿样品直接取自腊叶标本。

### 1.2 总DNA提取、目的序列的PCR扩增、克隆以及DNA测序

从干燥的叶片中提取总DNA采用CTAB法并略加改进。聚合酶链式反应(PCR)扩增

表2　材料来源
**Table 2**　Source of materials

| 样品 Sample | 凭证标本 Voucher | 采集地 Locality | 序列号 GenBank number ITS | 序列号 GenBank number *trn* L-F |
|---|---|---|---|---|
| 树锦鸡儿 *Caragana sibrica* | Hx0301 | 内蒙古呼和浩特 Huhhot, Nei Mongol | AY626912 | AY633698 |
| 中间锦鸡儿 *C. davazamcii*-1 | Hx0303-1 | 内蒙古呼和浩特 Huhhot, Nei Mongol | AY626913 | AY633699 |
| 中间锦鸡儿 *C. davazamcii*-2 | Zhao0370 | 内蒙古伊克昭盟 Ih Ju Meng, Nei Mongol | – | – |
| 中间锦鸡儿 *C. davazamcii*-3 | Zhao8205 | 内蒙古二连浩特 Erenhot, Nei Mongol | – | – |
| 柠条锦鸡儿 *C. korshinskii*-1 | Hx0308 | 内蒙古呼和浩特 Huhhot, Nei Mongol | AY626914 | AY633700 |
| 柠条锦鸡儿 *C. korshinskii*-2 | Hx0461 | 内蒙古阿拉善盟 Alxa Meng, Nei Mongol | – | – |
| 小叶锦鸡儿 *C. microphylla*-1 | Hx0334 | 内蒙古锡林郭勒盟 Xilin Gol Meng, Nei Mongol | AY626915 | AY633701 |
| 小叶锦鸡儿 *C. microphylla*-2 | Hx0310 | 内蒙古呼和浩特 Huhhot, Nei Mongol | – | – |

ITS序列的程序为: 70 ℃预热4 min, 2个循环的94 ℃变性1 min, 52 ℃退火20 s和72 ℃延伸50 s; 然后是35个循环的94 ℃变性20 s, 52 ℃退火20 s, 72 ℃延伸50 s, 随后72 ℃延伸7 min。*trn*L-F序列的扩增程序为: 94 ℃预变性3 min, 35个循环的94 ℃变性30 s, 57 ℃退火30 s, 72 ℃延伸90 s; 随后72 ℃延伸7 min。

ITS序列扩增采用通用引物: ITS1(5′-GGAAGTAAAAGTCGTAACAAGG-3′)和ITS4(5′-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3′)(White et al., 1990); *trn*L-F序列扩增采用通用引物c (5′-CGAAATCGGTAGACGCTACG-3′)和通用引物f (5′-ATTTGAACTGGTGACACGAG-3′)(Taberlet et al., 1991)。

ITS序列扩增产物取50 μL(约20 μg)直接纯化和测序, 3 μL(约1.2 μg)用于克隆。PCR产物使用购自大连宝生物公司的TA克隆载体pMD18-T克隆, 选取经蓝白斑筛选和*Eco*RI＋*Sal*I双酶切筛选的15个阳性克隆寄往上海生工测序(这2个酶切位点分别位于克隆载体上基因插入位点的两侧, 酶切获得预期大小片段者视为阳性克隆); *trn*L-F序列扩增产物取50 μL(约20 μg)直接纯化和测序, 并不进行克隆测序。所有序列均进行双向测序, 对测序结果首先进行手工判读和校对, 以发现叠峰等难以判读之处; 然后用VectorNTI软件拼接, 从而保证测序结果的可靠性。

**1.3**　数据分析

序列用CLUSTAL W(Thompson et al., 1994)软件进行对位排列后再进行手工校正。系统发育分析采用PAUP 4.0版beta 10(Swofford, 2002)中的似然法和简约法进行, 其中最大似然性(ML)分析选择分支界限法(branch and search)进行1000次搜寻; 最大简约性(MP)分析也选用分支界限法进行, 对于由序列长度多态性所造成的空位(gap), 在运算中处理为缺失(missing)状态。使用1000次重复的自展(bootstrap)检验评价系统发育树拓扑结构的可

靠性(Felsenstein, 1985)。序列间进化距离根据Kimura-2参数遗传距离模型用MEGA计算(Kimura, 1981; Kumar et al., 1993)。

## 2 结果

### 2.1 序列特点

ITS序列的扩增长度为654–690 bp, 对位排列后长度为710 bp, 包括64个变异位点, 其中44个为信息位点。该片段包括ITS1(232–267 bp)、5.8S(164 bp)和ITS2(253–261 bp), ITS1含信息位点21个, 5.8S序列含信息位点2个, ITS2含信息位点21个。

对小叶锦鸡儿样品*C. microphylla*-1和*C. microphylla*-2的ITS序列进行PCR产物直接测序的结果显示, 在其ITS1区域179 bp处和ITS2区域131 bp各有1处叠峰(其中1个峰信号较弱)。克隆测序后发现, 这2处叠峰的确代表了不同的碱基, 据此可将其ITS序列分为两种类型: A型在ITS1区域179 bp处为A, ITS2区域131 bp处为C; B型在ITS1区域179 bp处为T, ITS2区域131 bp处为T。*C. microphylla*-1的15个克隆中3个为A型, 12个为B型; *C. microphylla*-2的15个克隆中5个为A型, 10个为B型。对中间锦鸡儿样品*C. davazamcii*-1至*C. davazamcii*-3的ITS序列进行PCR产物直接测序, 所获图谱均未发现叠峰。克隆测序的结果证实, 这3个样品的15个克隆均为B型(与小叶锦鸡儿B型序列完全一致)。对柠条锦鸡儿样品*C. korshinskii*-1和*C. korshinskii*-2的ITS序列进行PCR产物直接测序的结果显示, ITS2区域74 bp处有1叠峰(其中1个峰信号亦较弱)。克隆测序后发现, 其ITS序列亦可分为两种类型: A型在ITS2区域74 bp处为G, B型在此处为C, 而小叶锦鸡儿和中间锦鸡儿在此处均为A。*C. korshinskii*-1的15个克隆中14个为A型, 1个为B型; *C. korshinskii*-2的15个克隆中13个为A型, 2个为B型(表2中所列ITS序列的GenBank接收号是小叶锦鸡儿B类型序列和柠条锦鸡儿A类型序列的)。对树锦鸡儿样品的ITS序列进行PCR产物直接测序, 所获图谱未发现明显叠峰, 未进行克隆测序。

*trn*L-F序列PCR产物直接测序未发现叠峰等难以判读之处, 故未进行克隆测序。该序列包括*trn*L(UAA)基因的内含子(intron)和3′外显子(exon), 以及*trn*L(UAA)-*trn*F(GAA)基因间隔区(IGS)。序列扩增后长度为1009–1021 bp, 对位排列后长度为1053 bp, 包括87个变异位点, 其中54个为信息位点。小叶锦鸡儿和中间锦鸡儿的5个样品*trn*L-F序列测序结果完全一致。ITS序列提供的信息(6.2%)较*trn* L-F序列(5.1%)多, 详细信息见表3。

### 2.2 序列间进化距离

根据Kimura-2参数遗传距离模型计算得到的ITS序列间进化距离见表4, 其中树锦鸡儿与柠条锦鸡儿之间的距离为0.1128–0.1145, 与小叶锦鸡儿和中间锦鸡儿之间的距离为0.1959–0.1996, 小叶锦鸡儿和中间锦鸡儿之间的距离仅为0–0.0031(即序列差异仅存在于不同类型克隆之间)。*trn*L-F序列间进化距离见表5, 其中树锦鸡儿与柠条锦鸡儿之间的距离为0.1013, 与小叶锦鸡儿和中间锦鸡儿之间的距离为0.1701, 小叶锦鸡儿和中间锦鸡儿之间的距离为0。

表3　各DNA序列的参数
**Table 3**　Characteristics for each DNA sequence

| DNA 序列 DNA sequence | 序列对位长度 Aligned length (bp) | 变异位点 Variable site | 信息位点 Informative site | 信息位点(%) Informative site (%) | GC (%) | 树长 Tree length | *CI* | *RI* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| ITS | 710 | 64 | 44 | 6.2 | 72 | 72 | 0.91 | 0.91 |
| *trn*L-F | 1053 | 87 | 54 | 5.1 | 35 | 214 | 0.95 | 0.91 |
| ITS/ *trn*L-F | 1763 | 151 | 98 | 5.6 | 50 | 289 | 0.92 | 0.89 |

表4　ITS序列间的Kimura进化距离
**Table 4**　Pairwise divergence of ITS sequences using Kimura-2-parameter distance

| 样品 Sample | C.sib | C.kor-A | C.kor-B | C.dav-B | C.mic-A | C.mic-B |
|---|---|---|---|---|---|---|
| C.sib | | 0.1145 | 0.1128 | 0.1996 | 0.1959 | 0.1996 |
| C.kor-A | 0.0042 | | 0.0015 | 0.0994 | 0.0961 | 0.0994 |
| C.kor-B | 0.0045 | 0.0031 | | 0.0980 | 0.0947 | 0.0980 |
| C.dav-B | 0.0039 | 0.0051 | 0.0054 | | 0.0031 | 0.0000 |
| C.mic-A | 0.0047 | 0.0063 | 0.0035 | 0.0033 | | 0.0031 |
| C.mic-B | 0.0039 | 0.0051 | 0.0054 | 0.0037 | 0.0046 | |

上右是距离值,下左是标准差值。
Distance values are in the upper right matrix, and standard errors are in the lower left matrix.
C.sib=*C. sibrica*; C.kor=*C. korshinskii*; C.dav=*C. davazamcii*; C.mic=*C. microphylla*; A and B indicate different types of clones.

表5　*trn*L-F序列间的Kimura进化距离
**Table 5**　Pairwise divergence of *trn*L-F sequences using Kimura-2-parameter distance

| 样品 Sample | C.sib | C.kor | C.dav | C.mic |
|---|---|---|---|---|
| C.sib | | 0.1013 | 0.1701 | 0.1701 |
| C.kor | 0.0033 | | 0.0923 | 0.0923 |
| C.dav | 0.0052 | 0.0042 | | 0.0000 |
| C.mic | 0.0039 | 0.0061 | 0.0055 | |

说明见表 4。
For the explanation of abbreviations, see Table 4.

## 2.3　系统发育分析

对ITS和*trn*L-F序列分别采用最大简约法(MP)和最大似然法(ML)进行系统发育分析。ITS序列获得最简约树2个, *trn*L-F序列获得最简约树1个, 表3中列出了其严格一致树的树长、一致性指数(*CI*)和保持指数(*RI*)。最大似然法得到的系统发育树在分支结构上与最大简约法树完全一致, 自展支持率略有不同, 图1、2中只展示了最大似然树。若仅选择小叶锦鸡儿和柠条锦鸡儿ITS的A或B类型序列进行分析, 则由ITS和*trn*L-F序列获得的系统树分支结构非常相似或完全一致, 故基于ITS单一类型序列的系统树并未展示。图1显示, 中间锦鸡儿和小叶锦鸡儿所有样品的B类型ITS序列聚在一起并获得100%的支持率, 小叶锦鸡儿A类型ITS序列同样聚在一起, 二者构成一个单系分支并获得99%的支持率, 该分支与柠条锦鸡儿构成姐妹群关系, 最后再与树锦鸡儿的分支构成姐妹群。图2显示, 中间锦鸡儿和小叶锦鸡儿的所有样品构成一个单系分支并获得100%的支持率, 然后与柠条锦鸡儿构成姐妹群关系, 最后与树锦鸡儿的分支构成姐妹群。

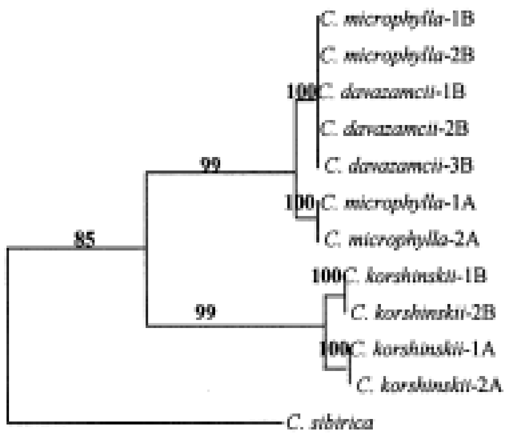



图1 ITS序列的最大似然树，分支上的数字为自展支持率
**Fig. 1.** The maximum likelihood tree based on ITS; numbers above branches indicate bootstrap values.

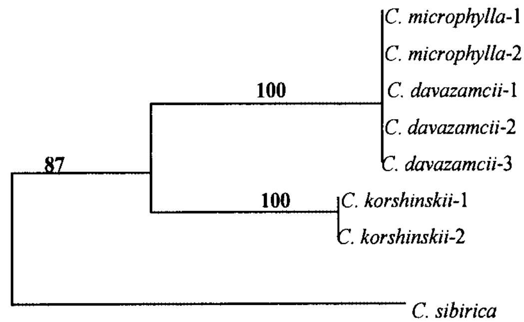



图2 *trn*L-F序列的最大似然树，分支上的数字为自展支持率
**Fig. 2.** The maximum likelihood tree based on *trn*L-F; numbers above branches indicate bootstrap values.

## 3 讨论

在本研究中，中间锦鸡儿的样品来自分布区内自南至北3个采集点，其ITS的测序结果完全一致且均未显示碱基的粘合，因而不支持该种为杂交起源的推测。但我们在小叶锦鸡儿和柠条锦鸡儿中发现了ITS序列的粘合性并从中分别得到了两种完全不同的ITS克隆。中间锦鸡儿ITS序列与小叶锦鸡儿一种类型的ITS序列完全一致，其*trn*L-F序列也与小叶锦鸡儿的完全一致，因此在系统发育树中二者构成一个单系分支并获得强的支持率。这种遗传上的高度同源提示我们，这两个二倍体种(2*n*=16)(富象乾，1989)的亲缘关系很近，序列间进化距离的数据也支持这一结论(表4，5)。在形态上，中间锦鸡儿也与小叶锦鸡儿更为相近，与柠条锦鸡儿则从小叶形状上就可以区分(表1)。这一现象最可能的解释是：小叶锦鸡儿本身是一个杂交起源的物种，其亲本之一为中间锦鸡儿，另一亲本可能位于小叶系或者其外的类群。柠条锦鸡儿也具有两种ITS类型，这种ITS的杂合性可以解释为：这两个物种可能起源较晚，致同进化(concerted evolution)尚未将所有的ITS拷贝形成完全一致的序列。但本文的研究结果尚不足以阐明柠条锦鸡儿的起源，揭示这3个物种起源和种间关系还需要对小叶系及其邻近物种进行更为广泛和深入的研究。

小叶锦鸡儿ITS的杂合性也有可能是近期基因渗入的结果。王洪新等(1994a，b)在研究了毛乌素沙地锦鸡儿的种群形态变异和种子蛋白多样性后认为这3个种在形态上不易辨别，而且其高度异交的生殖方式造成了强大的基因流，导致种间的界限更为模糊，魏伟等(1999)和周永刚等(2000)基于RAPD和种子蛋白多样性的研究也支持这一结论。由于中间锦鸡儿的*trn*L-F序列与小叶锦鸡儿完全一致，而ITS序列也与后者的两种类型之一相同，如果不是小叶锦鸡儿的杂交起源导致二者形态相似，那么二者之间肯定存在着频繁的基因交流。

柠条锦鸡儿2个样品的ITS序列均存在杂合性，但克隆鉴定的任何一种类型均与中间锦鸡儿显著差别，序列间进化距离为0.0980–0.0994；其*trn*L-F序列也与中间锦鸡儿有明显差异，序列间进化距离为0.0923。这一结果不支持Yakovlev(1988)认为中间锦鸡儿与柠条锦鸡儿同种的观点，以及张明理和朱光华(2004)认为中间锦鸡儿与柠条锦鸡儿亲缘关系更近，甚至可能源于该物种，并处理为该物种的种下分类群等观点。本文研究发现，中间锦鸡儿的ITS拷贝表现为纯合，因此可能是一个十分稳定的物种。而其余两个物种则可能由于杂交起源、基因流或者其他原因造成ITS序列的杂合。

如果说中间锦鸡儿与小叶锦鸡儿形态上的相似是由于中间锦鸡儿参与了后者的物种形成过程或者基因流所致，那么中间锦鸡儿为何与另外一个二倍体种——柠条锦鸡儿在形态上也如此相似呢？Ma等(2003a, b)在研究了不同地区分布的小叶锦鸡儿、中间锦鸡儿和柠条锦鸡儿的形态、生长发育、种群的遗传结构以及光合特性和水分代谢特性等后认为，以上形态、生理和遗传指标均呈现沿分布区自东向西的渐变。推测这种渐变可能是适应环境演变的结果。小叶锦鸡儿适应半湿润及半干旱气候，中间锦鸡儿和柠条锦鸡儿则适应干旱至强干旱气候，二者生境更为相近。在适应相近生境的过程中，由于趋同进化，亲缘关系相对较远的中间锦鸡儿和柠条锦鸡儿也可能演化出一些较为相近的形态学特征。

## 参　考　文　献


Bakker F T, Gulham A, Daugherty L C, Gibby M. 1999. A *trn*L-F based phylogeny for species of *Pelargonium* (Geraniaceae) with small chromosomes. Plant Systematics and Evolution 216: 309–324.

Baldwin B G. 1992. Phylogenetic utility of the internal transcribed spacer of the nuclear ribosomal DNA in plants: an example from the Compositae. Molecular Phylogenetics and Evolution 1: 3–16.

Baldwin B G, Sanderson M J, Wojciechowski M F, Campbell C S, Donghue M J. 1995. The ITS region of nuclear ribosomal DNA: a valuable source of evidence on angiosperm phylogeny. Annals of Missouri Botanical Garden 82: 247–277.

Felsenstein J. 1985. Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. Evolution 39: 783–791.

Fu H-C (富象乾). 1977. *Caragana* Fabr. In: Ma Y-C (马毓泉) ed. Flora Intramongolica (内蒙古植物志). Hohhot: Inner Mongolia People's Publishing House 3: 163–179.

Fu H-C (富象乾). 1989. *Caragana* Fabr. In: Ma Y-C (马毓泉) ed. Flora Intramongolica (内蒙古植物志). 2nd ed. Hohhot: Inner Mongolia People's Publishing House 3: 215–238.

Gao L-M (高连明), Li D-Z (李德铢), Zhang C-Q (张长芹). 2003. Phylogenetic relationships of *Rhododendron* section *Azaleastrum* (Ericaceae) based on ITS sequences. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 41: 173–179.

Kajita T, Kamiya K, Nakamura K, Tachida H, Wickneswari R, Tsumura Y, Yoshimaru H, Yamazaki T. 1998. Molecular phylogeny of Dipterocarpaceae in Southeast Asia based on nucleotide sequences of *mat*K, *trn*L intron, and *trn*L-*trn*F intergenic spacer region in chloroplast DNA. Molecular Phylogenetics and Evolution 10: 202–209.

Kimura M. 1981. Estimation of evolutionary distances between homologous nucleotide sequences. Journal of Molecular Evolution 16: 111–120.

Komarov V L. 1909. Generis *Caragana* Monographia. Acta Horti Petersburg 29: 205–352.

Komarov V L. 1945. V. L. Komarov Opera Selecta. Moscow: Nauka. 159–342.

Kumar S, Tamura K, Nei M. 1993. MEGA: molecular evolutionary genetic analysis, version 1.01. Institute of Molecular Evolutionary Genetics, Pennsylvania State University, University Park PA, 16802, USA.

Liou Y-X (刘媖心). 1984. Some new species of *Caragana* and *Chesneya* from China. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 22: 209–216.

Ma C-C, Gao Y-B, Liu H-F, Wang J-L, Guo H-Y. 2003a. Interspecific transition among *Caragana*

*microphylla*, *C. davazamcii* and *C. korshinskii* along geographic gradient. I. ecological and RAPD evidence. Acta Botanica Sinica 45: 1218–1227.

Ma C-C, Gao Y-B, Guo H-Y, Wang J-L. 2003b. Interspecific transition among *Caragana microphylla*, *C. davazamcii* and *C. korshinskii* along geographic gradient. II. characteristics of photosynthesis and water metabolism. Acta Botanica Sinica 45: 1228–1237.

Sanczir Cz. 1974. A new species of *Caragana*. Botanicheskii Zhurnal 59: 233.

Sang T, Crawford D J, Stuessy Y F. 1995. Documentation of reticulate evolution in peonies (*Paeonia*) using internal transcribed spacer sequences of nuclear ribosomal DNA: implications for biogeography and concerted evolution. Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 92: 6813–6816.

Sang T, Crawford D J, Stuessy Y F. 1997. Chloroplast phylogeny, reticulate evolution, and biogeography of *Paeonia* (Paeoniaceae). American Journal of Botany 84: 1120–1136.

Soltis D E, Soltis P S. 1998. Choosing an approach and an appropriate gene for phylogenetic analysis. In: Soltis D E, Soltis P S, Doyle I I eds. Molecular Systematics of Plants. II. DNA Sequencing. Boston: Kluwer Academic Publishers. 47–73.

Swofford D L. 2002. PAUP* 4.0: Phylogenetic Analysis Using Parsimony (*, and other methods). Beta version 4.0 b10. Sunderland: Sinauer Associates.

Taberlet P, Gielly L, Pautou G, Bouvet J. 1991. Universal primers for amplification of three non-coding regions of chloroplast DNA. Plant Molecular Biology 17: 1105–1109.

Thompson J D, Higgins D G, Gibson T J. 1994. CLUSTAL W: Improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position specific gap penalties and weight matrix choice. Nucleic Acids Research 22: 4673–4680.

Wang H-X (王洪新), Hu Z-A (胡志昂), Zhong M (钟敏), Qian Y-Q (钱迎倩). 1994a. Seed protein diversity of *Caragana* populations in Maowusu sandy grassland and its biological implication. Acta Ecologica Sinica (生态学报) 14: 372–380.

Wang H-X (王洪新), Hu Z-A (胡志昂), Zhong M (钟敏), Qian Y-Q (钱迎倩). 1994b. Morphological variations of *Caragana* populations in the Maowusu sandy grass land. Acta Ecologica Sinica (生态学报) 14: 366–371.

Wang Y-J (王玉金), Liu J-Q (刘健全). 2004. A preliminary investigation on the phylogeny of *Saussurea* (Asteraceae: Cardueae) based on chloroplast DNA *trn*L-F sequences. Acta Phytotaxonomica Sinica (植物分类学报) 42: 136–153.

Wei W (魏伟), Wang H-X (王洪新), Hu Z-A (胡志昂), Zhong M (钟敏), Yun R (恽锐), Qian Y-Q (钱迎倩). 1999. Primary studies on molecular ecology of *Caragana* spp. populations distributed over Maowusu sandy grassland: from RAPD data. Acta Ecologica Sinica (生态学报) 19: 16–22.

White T J, Bruns T, Lee S, Taylor J W. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis M A, Gelfand D H, Sninsky J J, White T J eds. PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications. San Diego: Academic Press. 315–322.

Xu L-R (徐朗然), Hao X-Y (郝秀英). 1989. A study on classification and distribution of *Caragana* on Loess Tableland and Mount Qin. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica (西北植物学报) 9: 92–101.

Yakovlev G P. 1988. Plantae Asiae Centralis. Leningrad: Nauka. 8a: 24–44.

Zhang M-L. 2004. Ancestral area analysis of the genus *Caragana* (Leguminosae). Acta Botanica Sinica 46: 253–258

Zhang M-L (张明理), Zhu G-H (朱光华). 2004. A new combination of *Caragana* (Fabaceae) from China. Bulletin of Botanical Research (植物研究) 24: 5–6.

Zhao Y-Z (赵一之). 1990. The study of the *Caragana davazamcii*. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nei Mongol (内蒙古大学学报自然科学版) 21: 560–563.

Zhao Y-Z (赵一之). 1993. A taxonomic study on *Caragana* in China. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nei Mongol (内蒙古大学学报自然科学版) 24: 631–653.

Zhou Y-G (周永刚), Wang H-X (王洪新), Hu Z-A (胡志昂). 2000. Seed protein polymorphism within individual plants and mating system. Acta Botanica Sinica (植物学报) 42: 910–912.